pCO_2在哺乳动物细胞培养中的影响和应用

刘小双[1] 陈飞[2] 赵孟江[2] 洪巧巧[2] 徐寒梅[1*]
（1 中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009
2 上海药明生物技术有限公司 上海 200131）

摘要

二氧化碳分压(pCO_2)是哺乳动物细胞培养中一个重要参数，其主要来源包括细胞有氧呼吸产生的CO_2、培养基中碳酸氢盐和 pH 控制加入的CO_2。一般细胞培养中不精确控制pCO_2，但是将pCO_2水平维持在一定范围(30 - 80 mmHg)十分重要，pCO_2过高(> 80 mmHg)和过低(< 30 mmHg)不利于细胞生长、代谢、以及蛋白生产和质量控制。大规模高密度细胞培养过程中高pCO_2问题比较常见，因此工艺放大时需要考虑不同规模细胞培养中pCO_2水平的差异。本文综述了哺乳动物细胞培养中pCO_2对细胞生长、代谢和蛋白生产的影响，以及大规模中控制pCO_2的方法。

关键词

二氧化碳分压；哺乳动物细胞；细胞培养；pCO_2控制

* 通讯作者，电子邮箱：13913925346@126.com (电话:13913925346，地址：江苏省南京市江宁区龙眠大道639 号中国药科大学)
[1] 第一作者，电子邮箱：19946233551@163.com (电话:19946233551，地址：上海市浦东新区外高桥保税区福特中路 288 号)

The effect and application of pCO_2 in mammalian cell culture process

LIU Xiao-shuang[1] CHEN-Fei[2] ZHAO Meng-jiang[2] HONG qiao-qiao[2] XU Han-mei[12]

(1 College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

(2 WuXi Biologics, Shanghai 200131, China)

Abstract

Carbon dioxide partial pressure (pCO_2) is an important parameter in mammalian cell culture, which come from cell respiration, bicarbonate in culture media and CO_2 added during culture for pH maintenance. Generally, pCO_2 is not precisely controlled like pH in cell culture, but it is crucial to maintain pCO_2 level within a reasonable range, usually ranging from 30 to 80 mmHg. Higher (> 80mmHg) or lower (< 30mmHg) pCO_2 levels were reported to be detrimental to cell growth, metabolism, productivity and product quality. Higher pCO_2 is always encountered during scale-up, especially for the high density perfusion culture. Therefore, pCO_2 difference between small scale (< 15 L) and large scale (> 200L) needs to be considered. This review illustrates the effects of pCO_2 on cell growth, metabolism, productivity and product quality. In addition, the approaches to control pCO_2 during scale-up are also discussed.

Key words

CO_2 partial pressure (pCO_2); Mammalian cell; Cell culture process development; pCO_2 control

[2] 通讯作者，电子信箱：13913925346@126.com

前言

单克隆抗体药物为一些重要疑难杂症如肿瘤、自身免疫疾病等的治疗带来了新的曙光，成为近 20 年来增长速率最快的一类生物技术药物。基于生物反应器的动物细胞大规模培养技术是抗体药物工业化生产的核心技术。如何更高效更高质地生产抗体药物，是各药企和研究单位的发展目标和核心竞争技术，其中对生物药物生产过程一致性的要求，是动物细胞大规模培养过程开发和优化的重要环节。然而在大规模生产过程中，pCO_2 水平易出现过高的现象，是造成大小规模细胞培养工艺表现一致性差的原因之一。研究 pCO_2 对细胞的影响，总结和建立 pCO_2 控制方法在工艺放大中意义重大。下面综述 pCO_2 对细胞生长代谢和蛋白生产的影响，降低大规模反应器中高 pCO_2 的方法，以及细胞培养工艺放大中 pCO_2 控制的研究现状和展望。

1 细胞培养中的 pCO_2

1.1 CHO 细胞代谢中 CO_2 的位置

二氧化碳是细胞代谢的产物之一。在过去的二十多年中，为阐明中国仓鼠卵巢细胞(CHO)等哺乳动物细胞系的代谢，科学家们利用同位素示踪和质谱分析的代谢流分析法(MFA)以及动态代谢流分析组合的方法研究了CHO-K1细胞不同生长阶段的物质和能量代谢水平[1, 2]。CHO细胞的中心代谢途径特征及CO_2在细胞代谢中的位置如**图 1**所示。

CHO-K1细胞指数生长期(0-4天，第一天到第二天的比生长速率为$0.033h^{-1}$)糖酵解(Glycolysis)和回补反应(Anaplerosis)水平较高，细胞数量快速增长。回补途径中CO_2/HCO_3^-作为底物和丙酮酸发生羧化反应产生草酰乙酸；谷氨酰胺分解生成α-酮戊二酸；苹果酸在苹果酸酶(ME, Malic enzyme)催化下生成丙酮酸，为三羧酸循环(TCA循环)补充中间产物。所以指数生长阶段，CO_2既是反应底物也是代谢产物。稳定期(4-6天)细胞糖酵解反应和回补反应大大减少，TCA循环水平和指数生长期一致。此阶段氧化戊糖磷酸(oxidative Pentose phosphate pathway)途径代谢流较高，是细胞产生ATP和还原性辅酶A(NADH/NADPH)的主要代谢途径，为细胞提供能量和氧化应激所需的还原力[3]。由于细胞密度不断增加，稳定期细胞产生大量CO_2。细胞衰亡期营养都已耗尽，但细胞通过高效利用乳酸和甘氨酸补充丙酮酸，维持了TCA循环水平，用于细胞代谢和产热[2]。综上，细胞指数生长期需要CO_2/HCO_3^-作为反应底物，细胞稳定期和衰亡期则排出大量CO_2。作为细胞代谢中重要的底物和产物，CO_2是哺乳动物细胞培养工艺开发中一个备受关注的参数。

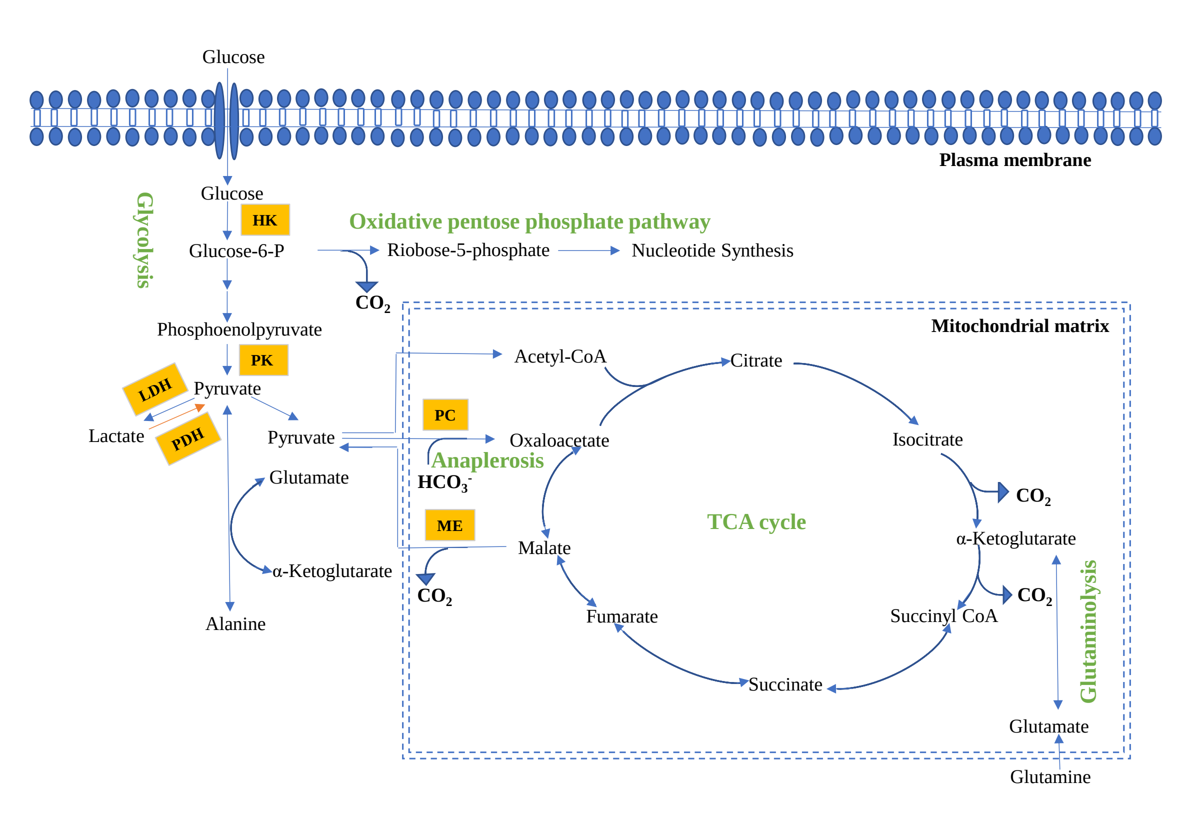


Figure 1. CO_2 in CHO cell central metabolism pathway[4-6]. Abbreviation for enzyme are shown in yellow boxes: HK, Hexokinase; PK, Pyruvate kinase; LDH, Lactate dehydrogenase; PDH, Pyruvate dehydrogenase; PC, Pyruvate carboxylase; ME, Malic enzyme.

图 1. CO_2 在 CHO 细胞中心代谢途径中的位置[4-6]。图中黄色方框内为酶的简写：HK，已糖激酶；PK，丙酮酸激酶；LDH，乳酸脱氢酶；PDH，丙酮酸脱氢酶；PC，丙酮酸羧化酶；ME，苹果酸酶。

1.2 细胞培养中 CO_2 的来源和逸出

细胞培养中 pCO_2 是溶解在培养液中的 CO_2 产生的压力。哺乳动物细胞培养中，CO_2 的来源包括细胞呼吸产生的 CO_2、培养基中 $NaHCO_3$ 的分解和控制 pH 加入的 CO_2 和 Na_2CO_3。动物细胞培养大多使用碳酸-碳酸氢盐(H_2CO_3-HCO_3^-)缓冲系统，培养基中碳酸氢盐浓度越大，相同 pH 下 pCO_2 越高，如**图 2**。37℃时，平衡体系中有[7]：

$$\mathrm{pH} = pK_2 + \log\left(HCO_3^- / H_2CO_3\right) \qquad (1)$$

由亨利定律可知：

$$H_2CO_3 = 0.0307 \times pCO_2 \qquad (2)$$

结合(1)和(2)有：

$$pCO_2 = \frac{HCO_3^-}{0.0307 \times 10^{(pH-pK2)}} \qquad (3)$$

由(3)可作一定浓度 HCO_3^-缓冲液中 pCO_2 和 pH 的关系，如**图 2** 所示。

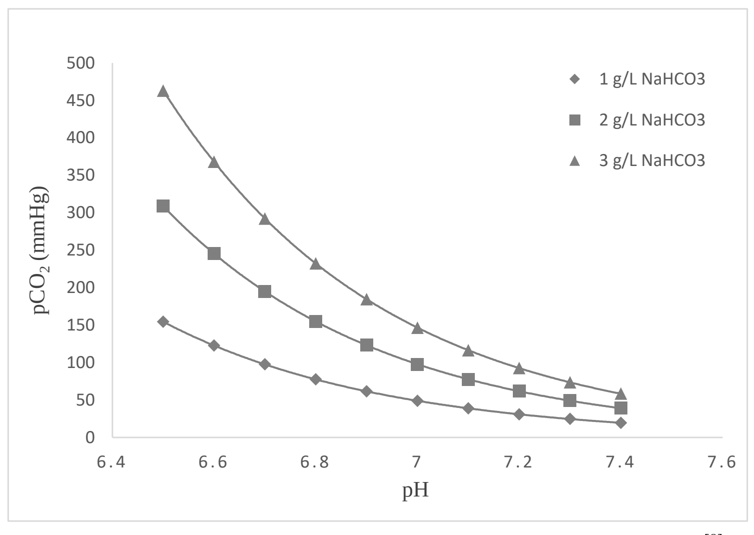


Figure 2. pH、bicarbonate and pCO_2 equilibrium in H_2CO_3-HCO_3^- buffer[8]

图 2. H_2CO_3-HCO_3^- 缓冲体系中 pH、碳酸氢盐和 pCO_2 的平衡关系图[8]

CO_2 逸出(CO2 stripping)是溶解在培养液中的 CO_2 从液相中脱离进入气相的过程。如**图 3** 所示，为 CO_2 气体溶解于培养液中所发生的反应，K_1、K_2 为反应平衡常数，CTR(carbon dioxide mass transfer rate)为 CO_2 传质速率，CER(carbon dioxide evolution rate)为细胞 CO_2 产生速率，K_La_{CO2} 为 CO_2 传质系数。培养系统中 CO_2 的逸出快慢用 CO_2 逸出速率(CO_2 stripping rate)表示，一般采用 pH 随时间的变化表示(△pH/△t)。理论上，当 CO_2 逸出速率等于 CO_2 生成速率时，培养系统中细胞产生的 CO_2 可以完全逸出而不影响 pCO_2 水平[9]。

Cell

CER

$$CO_2(g) \overset{K_La_{CO2}}{\leftrightarrow} CO_2(l) \overset{K_1}{\leftrightarrow} H_2CO_3 \overset{K_2}{\leftrightarrow} H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow 2H^+ + CO_3^{2-}$$

CTR

Figure 3. The equilibrium for CO_2 in the media[8]

图 3. 培养基中 CO_2 的平衡[8]

2. pCO_2在细胞培养中的作用和影响

2.1 作用原理

CO_2 及相应的水化物 HCO_3^-是细胞内羧化和脱羧反应的反应底物和产物(如错误!未找到引用源。)，CO_2/HCO_3^-水平过低限制细胞内回补反应的进行，导致 TCA 循环中前体物质草酰乙酸的限制，进而影响细胞生长和相关代谢物的生成[4]。研究表明哺乳动物细胞内拥有有效的 pH 调节机制，过高浓度的 HCO_3^-可能会影响 pH 调节机制[10]。CO_2 进入细胞质和线粒体后，溶解的 CO_2 解离出氢离子降低细胞内 pH(pHi)，迫使细胞增加 Na^+/H^+和 HCO_3^-/Cl^-逆向运输蛋白的速率来调节 pHi，从而打乱 pHi 的调节。CO_2/HCO_3^-浓度还影响细胞内酶的活性，pHi 的变化导致磷酸果糖激酶的催化反应偏离其最适 pH 范围[11]，影响细胞内 pH 敏感性唾液酸转移酶的活性[12]，进而影响细胞生长代谢和蛋白糖基化。高 pCO_2 水平降低细胞中与 CO_2 生成相关酶(异柠檬酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶)的浓度，导致 CO_2 比生成速率降低。高 pCO_2 和高 HCO_3^-环境使高活性氧族—过氧一碳酸盐(HCO_4^-)的形成增加，高活性氧使线粒体损伤，细胞呼吸受影响。HCO_4^-的增加还影响氧化磷酸戊糖反应，导致细胞稳定期能量产生减少[13, 14]。

CO_2 和 HCO_3^-对细胞代谢进行调控的机制到目前为止还没有被完全研究清楚，可能它们在细胞中所起的刺激作用被低估了[4]。高 pCO_2 影响细胞培养的研究还在不断增加，pCO_2 对细胞培养产生影响的机理也在不断被发现。

2.2 pCO_2 对细胞培养的影响

pCO_2 对哺乳动物细胞培养中细胞生长、代谢、蛋白产量及质量都会产生一定的影响，这些影响有来自于 pCO_2 单独发挥的作用，也有 pCO_2 与渗透压、pH 等联合发挥的作用[4]。早在二十多年前，研究者就发现 CO_2 积累超过一定浓度对细胞产生毒害作用，合适的 pCO_2 水平对细胞生长和蛋白表达十分重要[15]。随着研究的深入，发现不同细胞系对 pCO_2 的耐受能力不同，不同的细胞生长阶段对 pCO_2 的敏感程度也不同。

pCO_2 影响细胞内乳酸代谢及转变。乳酸从生成到消耗的代谢转变是哺乳动物细胞培养中一个普遍的特征，这种转变有利于细胞维持活率和提高蛋白产量[16]。研究发现，2000 L 一次性生物反应器(Singer Use Bioreactor，SUB)CHO 细胞批次流加培养中，高 pCO_2 下细胞乳酸代谢出现先消耗再生成的现象[17]。杂交瘤细胞[18]连续培养和葡萄糖限制的 CHO 细胞[19]连续培养中，在高 pCO_2 情况下乳酸比生成速率增加。原因可能是控制 pH 的细胞培养中，高 pCO_2 酸化溶液导致

碱液加入，大规模反应器混合不均一性导致加入碱液时局部 pH 过高，增加了控制 pH 所需的加碱量，刺激了乳酸再生成[17]。同时，碱液的加入使$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$的平衡右移，$HCO_3^-$堆积引起高渗透压，影响细胞乳酸代谢[20]。高 pCO_2、低 pH 和高渗透压三者单独对乳酸再生成的影响不显著，三者共同作用才导致乳酸再生成，这种乳酸再生成现象可以通过增加 CO_2 逸出消除[17]。杂交瘤细胞 2000 L 培养中，高 pCO_2 引起乳酸比生成率增加，通过提高通气速率(从 1 LPM(Liter Per Minutes，升/分钟)提高到 2.5 LPM)，达到了降低乳酸(浓度降低 50%)的目的[21]。相反，高 pCO_2 也可能导致乳酸生成速率降低，幼仓鼠肾细胞(Baby Hamster Kidney, BHK)灌流培养中 pCO_2 从约 84mmHg 升高到约 230mmHg 时，乳酸比生成率降低[22]。摇瓶培养中杂交瘤细胞[18, 23]和 CHO 细胞[24, 25]乳酸比生成率随 pCO_2 升高而降低。因此不同细胞和不同培养方式中，pCO_2 对细胞乳酸代谢的影响不同。

Brunner M 等[26]发现 CHO 细胞批次流加培养中，同样的 pH 水平下高 pCO_2 抑制乳酸代谢状态的转变。pCO_2 较高(20% CO_2)的培养组(高 pCO_2 组)与 pCO_2(12.5% CO_2)降低的培养组(对照组)相比，乳酸的代谢没有发生从产生到消耗的转变。高 pCO_2 组细胞在乳酸代谢转变之前(指对照组乳酸代谢转变之前)糖酵解水平、TCA 循环和呼吸作用都降低，代谢转变后高 pCO_2 组的糖酵解途径水平较对照组高，其他代谢流与对照组一致。最终高 pCO_2 组的细胞蛋白产量较对照组降低(1.1g/L : 2.0g/L)。

pCO_2 影响细胞生长和蛋白产率。CHO 细胞摇瓶培养中，pCO_2 设定在 76mmHg 和 152mmHg 时相比 38mmHg 时细胞生长受到严重抑制，密度仅仅为 0.5×10^6 cell/mL(接种密度为 0.2×10^6 cell/mL)；pCO_2 为零时，出现同样现象[15]。说明细胞生长初期需要一定浓度 CO_2，过高和过低的 pCO_2 都使细胞无法生长。反应器阶段的细胞培养中，大规模工业化细胞培养 pCO_2 可达到 150 - 200 mmHg，并对细胞生长和蛋白产量产生明显抑制作用[23]。Gray 等[15]发现 CHO 的灌流培养中，pCO_2 维持在 30 - 76 mmHg 时可获得最大的蛋白产量，pCO_2 过高(>105mmHg)则抑制细胞生长，降低蛋白产量。pCO_2 从 38mmHg 升高到 148 mmHg 左右时蛋白产量降低了 70%，产量的降低是蛋白产率降低(降低 50%)和细胞密度降低共同的结果。Darja 等[25]发现指数生长期 CHO 细胞在低温(33℃)和高 pCO_2(20% CO_2)的不利环境中优先消耗葡萄糖生成乳酸，细胞代谢向低效的无氧途径转变，且大量与抗氧化相关的蛋白上调，细胞处于氧化应激挑战下，细胞生长受到强烈抑制。Mostafa 和 Gu[27]使用 CHO 细胞生产治疗性糖蛋白过程中发现，工艺从 1.5 L 规模放大到中试 1000 L 反应器时，pCO_2 从 68 mmHg 升高到 179 mmHg，蛋白比生产率降低了 40%。Zhu 等[28]发现 CHO 细胞大规模培养中高

pCO_2(140 - 160 mmHg)和高渗透压(400 - 450 mOsm/kg)抑制细胞生长和蛋白产量。但是实验室规模下同样的培养工艺，细胞密度降低 18%，蛋白产量不受影响。不仅仅是 CHO 细胞，pCO_2 升高对其他动物细胞培养也有影响。骨髓瘤细胞批次培养中高 pCO_2 引起大量碱加入，造成 pH 波动，增加了细胞的死亡[29, 30]。杂交瘤细胞培养中，高 pCO_2 和高渗透压共同作用使细胞内 pH 降低，细胞糖酵解水平降低，谷氨酰胺消耗减少，抑制了细胞的生长但不影响抗体比生成速率[23]。研究表明适当的葡萄糖限制可以补偿较高 pCO_2 (190 mbar)导致的细胞生长下降，因为限制葡萄糖使乳酸生成减少，pH 调节需加入的碱量(渗透压)减少，细胞生长受到的影响也就减小[19]。还有研究者提出，对于某些乳酸消耗能力较强的细胞系，在细胞培养稳定期使用乳酸代替 CO_2 控制 pH，不仅可以减少 pCO_2 升高的可能，还能减少甘氨酸的利用，改善培养后期氨浓度升高的问题[31]。

pCO_2 影响细胞蛋白糖基化。Zanghi[32]等发现高 pCO_2 对 CHO 细胞蛋白糖基化的影响不大，高 pH 和高 pCO_2 条件下 HCO_3^-和渗透压升高才是神经细胞黏附因子中多聚唾液酸降低的根本原因，且在同样的渗透压改变程度下，HCO_3^-相比 NaCl 对多聚唾液酸降低的影响更大。有趣的是，CHO 细胞培养中，高 pCO_2 (140 mmHg) 环境下细胞分泌的糖蛋白中非人源唾液酸衍生物(N-羟乙酰神经氨酸)成分比低 pCO_2(20 - 80 mmHg)环境下降低了 46%，由于 N-羟乙酰神经氨酸的存在增加免疫原性的发生，所以此案例显示了 CO_2 积累对细胞培养蛋白质量的益处。

3 大规模细胞培养中 pCO_2 的研究和应用

由于反应器结构特征的差异，大规模反应器液面高度和静水压增加使气体溶解度增加，导致垂直方向上 pO_2 (O_2 分压)和 pCO_2 梯度渐变，同时由于代谢活动、传质限制和大规模中较低的混合效率带来的径向渐变，造成了大规模反应器中培养环境的不均一性[33]。建立小规模模型模拟大规模反应器中不均一性对细胞代谢影响的研究日益增加，其中对底物、pH 和溶解氧(DO)的不均一性研究较多[34]。然而培养液中 CO_2/HCO_3^-浓度的波动变化是大规模反应器中典型的现象，却少有研究报道。其原因主要有两方面：一是培养液中 CO_2 来源多样反应复杂，二是由于不同规模下 CO_2 气体滞留时间不同影响 CO_2 传质系数的测定，pCO_2 难以控制，研究的难度也较大。下面综述大规模中 CO_2 积累的原因和降低大规模中高 pCO_2 的方法。

3.1 大规模细胞培养中 CO_2 积累的原因

大规模细胞培养中 CO_2 积累更容易发生，主要有以下原因：1) 大规模反应器液体表面积与体积比减小，导致表面 CO_2 传质降低，所以大规模中 CO_2 总溢

出速率减小，造成 CO_2 积累[8]；2) 大规模反应器高度较大，液位高度更大，静水压变大，增加了 CO_2 的溶解度；3) 大规模反应器的混合效果较差。研究者[35]测试了不同规模搅拌式一次性生物反应器 (STR, stirred single-use bioreactor)的混合时间，同样的桨叶尖端速度下(0.6 m/s)，STR 2000L、1000L、500L、200L 和 50L 反应器的混合时间分别为 68、60、35、35 和 19 秒左右，混合时间随反应器规模增大而增加。不同类型反应器的混合时间也不同，相同体积输出功率(20 W/m^3）下 2000 L SUB 反应器的混合时间为 100s 左右，而 3L 反应器只有不到 10 s[17]。4) 细胞培养工艺放大时，一般采用等 k_La(氧气传质系数)原则，大规模中氧气传质更好，因此大规模通气量减小，造成 CO_2 溢出速率减小，CO_2 积累增加；5) 大规模生产中，一般在细胞密度达到一定水平时使用微泡通氧或者增加气体中氧气含量，以满足细胞生长氧量的需求，微泡的使用及氧气含量的增加都会使总的通气量减少，从而降低 CO_2 的溢出速率[15]。

3.2 大规模 pCO_2 控制策略

pCO_2 水平是培养系统中 CO_2 生成和逸出互相抗衡的结果，细胞代谢一定的情况下，pCO_2 水平主要由培养基性质和操作状态决定。从培养系统中 pCO_2 的来源和影响因素着手，降低 pCO_2 的方法包括以下两方面。

从降低培养基中 HCO_3^-来源方面考虑。幼仓鼠肾细胞(baby hamster kidney, BHK)密度为 20×10^6cells/mL 的灌流培养中，细胞产生的 CO_2、培养基中的 $NaHCO_3$ 和控制 pH 所加入的 $NaHCO_3$ 对 pCO_2 的贡献分别占 25%、35%和 40%。使用 MOPS-Histidine(3-(N-玛琳代)丙磺酸-组氨酸)缓冲液代替原来培养基中的 $NaHCO_3$ 缓冲液，并改用 Na_2CO_3 代替 $NaHCO_3$ 作为碱控制 pH，结果 BHK 细胞 15L 灌流培养中 pCO_2 从原来的 225 mmHg 降低到 68~73 mmHg，降低了 68-70%；1000L 灌流培养中 pCO_2 从原来的 238±16mmHg 降低到 84±7mmHg，降低了 65%[22]。此方法从源头上降低 pCO_2，避免改变反应器设置和培养条件，在实际应用中具有简单易操作的优势。Mostafa 和 Gu[27]尝试用同样的方法降低 1000 L CHO 细胞批次流加培养后期高 pCO_2，结果发现 3 L 小规模实验中，使用不同含量 $NaHCO_3$ 的培养基(0.5 g/L 和 2 g/L)对降低培养后期 pCO_2 的水平没有显著影响。且低浓度 $NaHCO_3$ 培养基缓冲能力低，对于 pH 控制范围较窄的工艺不利。这种情况下可选用其他缓冲溶液代替 HCO_3^-缓冲液。采用适当放宽 pH 的控制范围(如将 pH 下限降低以减少碱的加入)和改变补料的 pH(使补料起到 pH 控制的作用，从而减少酸碱加入)的方法在小规模细胞培养中也可以达到降低 pCO_2 的目的(数据未列出)。

从增加 CO_2 传质方向考虑。CO_2 传质速率$\mathrm{CTR} = K_L a_{CO2}(C* - C)$其中 K_L 是

CO_2体积传质系数，a 是气泡比表面积，C 是溶液中溶解的 CO_2浓度，C*是气液界面的 CO_2浓度，即气泡中 CO_2的浓度[36]。K_L与反应器的结构、培养液的性质、操作状态有密切关系。反应器结构方面，搅拌桨叶轮的位置对气液混合和气体传质有影响，研究表明双桨系统中降低上方叶轮位置有利于气体传质[8]。培养液性质方面，研究表明 1000 L 大规模细胞培养中，培养基中 HCO_3^-浓度对 CO_2传质系数的影响可以忽略[8]。操作状态方面，表面通气和搅拌转速对大规模反应器的 CO_2传质影响较小。研究发现虽然在 80 L 和 500 L 反应器的 K_La_{CO2}随着表面通气速率(10 倍和 20 倍×底通速率)增加而增大，但更大规模反应器 2000 L 和 10000 L 中 K_La_{CO2}随表面通气增加而增大的幅度减小甚至到达饱和，这种现象是因为随着反应器规模增大，液体表面积与体积比值减小[37]。Sieblist[36]等发现大规模反应器(400 L 不锈钢反应器)中，当通气速率增大(3.25、4.5、9 LPM)时 K_La_{CO2}随之增大，而增加输出功率(38，200，300，870 W/m^3)对 K_La_{CO2}没有影响，即搅拌转速对 CO_2溢出没有显著影响。此现象也在 Mostafa 和 Gu[27]的研究中得到证实：不管是 1.5 L 小规模反应器还是 1000 L 大规模反应器中，CO_2溢出速率与通气速率呈强相关关系，与搅拌呈弱相关关系，通气速率越大 CO_2传质越好。虽然搅拌转速对 CO_2溢出影响较小，但是搅拌转速与气泡平均停留时间成正比，200 L 搅拌釜反应器中 200 rpm (rotation per minutes, 转/分钟) 搅拌转速下气泡停留时间不到 7s，而 500 rpm 搅拌转速时气泡平均停留时间为 11.3 s，因此搅拌速度的变化对气泡停留时间影响较大，对于细胞培养中氧气的传质有重要参考意义[36]。

通气流量和模式是影响 CO_2传质的重要因素，也是降低 pCO_2策略中最常考虑的方向，而通气流量和模式与气泡息息相关。从单个气泡来看，当气泡通过培养液的过程中，O_2不断从气泡传递到溶液，CO_2从溶液传入气泡。然而气泡中 CO_2含量在几秒内达到与培养液中 CO_2相同含量，即 CO_2饱和状态，气泡便不再吸收溶液中的 CO_2，因此大规模中 CO_2传质只是气泡通过溶液的过程中一段时间内的活动[36]。大规模反应器中气泡的停留时间比气泡饱和 CO_2的时间长，可以认为进入反应器顶部空间的气泡都饱和了 CO_2。所以大规模中 CO_2逸出量可简化为饱和气泡中 CO_2的量与气泡数量的乘积，其与 K_La_{CO2}和气泡大小无关，只由逸出的气泡总量或出气量决定[36]。相同 K_La_{CO2}的情况下，开放式通气管路(Open-pipe sparger)相比钻孔式底通(Drilled hole sparger)CO_2逸出速率更大，说明了 CO_2逸出速率不只受 K_La_{CO2}决定[8]。Mostafa 和 Gu[8]使用开放管式管路通气和加入少量消泡剂的方法，将 pCO_2水平控制在 61.2mmHg 以下，解决了原工艺 pCO_2高至 180mmHg 的问题。研究发现通气量相同情况下，2000 L 反应器中气泡直径大小对 CO_2溢出影响较小，不同底通出气孔径(10 微米，20 微米和 1 毫米)对 K_La_{CO2}的大小没有影响[37]。进一步说明了大规模培养中气泡总通气量才是决

定 CO_2 逸出速率的关键。

综上，大规模反应器中培养液 HCO_3^-的浓度、表面通气、搅拌桨叶轮位置以及搅拌转速的大小对 CO_2 溢出的影响较小，通气量和通气模式对 CO_2 的溢出影响较大，当气泡停留时间远大于气泡饱和 CO_2 的时间时，CO_2 溢出速率由总通气量决定，气泡大小的影响可以忽略。然而较大气泡对细胞损伤更小，实际应用中考虑到剪切力对动物细胞的伤害时，相同通气条件下大气泡比小气泡更优，但是大气泡相比于小气泡氧气传质更差，所以一般会通过增加氧气的比例来增加氧气传质，但这必然带来总通气量的降低，导致 CO_2 积累。虽然搅拌速度对 CO_2 传质影响较小，但是搅拌转速影响气泡停留时间，提高转速有利于氧气传质。所以实际应用中还应统筹考虑相关参数的设定。

总结与展望

CO_2是哺乳动物细胞中心代谢途径中的重要反应底物和代谢产物，其浓度的高低通过单独和偶联 pH、HCO_3^-、渗透压的作用影响细胞的生长、代谢甚至蛋白产量和质量。从 CO_2 的来源和逸出出发，结合细胞代谢和大规模反应器中 CO_2 传质的特点，一般采用减少 HCO_3^-和增大通气量和气泡大小的方法降低 pCO_2。生物药由于其用药剂量大，生产工艺放大是必须考虑的问题，放大过程中参数的控制是保证细胞生长环境一致的手段，然而 pCO_2 在小规模中不被精确控制，却在放大后极易出现波动和变大，影响工艺的表现。因此，为确保大小规模收获同样优质的细胞生长表现和一致的蛋白质量，在工艺放大中需综合考虑 pCO_2 水平和其他操作参数的设定，在保障关键质量参数一致和工艺操作简单可行的前提下，尽量缩小大小规模 pCO_2 的差异[38]。

目前，细胞培养工艺放大中 CO_2 逸出问题引起许多公司关注。Xu 等[9]采用等 VVM(Gas volume/working volume/min)和等 P/V 的放大策略，在细胞生长指数期使用恒定 VVM 提高 CO_2 逸出速率，成功使工艺放大后(3 L 放大到 500 L SUB)细胞培养过程的 pCO_2 维持在低于 50mmHg 的水平，但是此方法只适用于细胞指数生长期 pCO_2 过高的细胞。Xing 等[39]基于气泡停留时间和饱和时间的考虑，建立了大规模 pCO_2 预测模型，然而此模型中气泡停留时间和气泡中 CO_2 饱和时间计算复杂，且使用前提是细胞呼吸熵为 1，仅在部分细胞系中适用。目前还没有普适性的 pCO_2 预测模型能够在培养工艺放大之前预测大规模 pCO_2 水平，给放大参数的设定提供指导。因此，细胞培养工艺放大特别是高密度细胞培养工艺放大中，实现氧气供应和 CO_2 逸出平衡的挑战依然很大。

pCO_2 作为工艺放大中一个有价值的参数，其不仅反映了反应器混合和传质效果，还可能反映了细胞内复杂的代谢活动。因此建议在放大过程中(如**图 4**)，首先分析小规模细胞实验中 pCO_2 水平和影响 CO_2 传质速率的参数，计算小规模细胞培养中 CO_2 的代谢速率，然后根据放大后细胞代谢状态保持不变的原则，结合一般放大原则下制定的通气搅拌等策略，估算大规模 pCO_2 的水平，并评估此 pCO_2 水平是否影响细胞生长或蛋白产量和质量。若有影响，则根据大规模中想要控制的最高 pCO_2 水平，指导工艺放大中的通气搅拌等策略，从而减小高 pCO_2 对工艺的影响；若影响可以忽略，则需要在缩小模型(scale-down model)中模拟大规模高 pCO_2 的表现。另外，如果预测出来的 pCO_2 较小，说明放大后没有高 pCO_2 风险。目前存在着大小规模 CO_2 逸出速率计算不同的问题：小规模 CO_2 逸出速率的计算依据 CO_2 传质系数经验公式[27, 40]，大规模 CO_2 逸出速率考虑 CO_2 气体滞留时间和饱和时间的影响[36, 39]。因此 CO_2 逸出速率的准确计算需要进一步研

究。此外，pCO_2 电极的使用可以实现 pCO_2 的在线检测和反馈控制，使 pCO_2 和 pH、DO 等参数一样可以被精确控制，将是未来细胞培养中 pCO_2 控制的发展趋势之一。

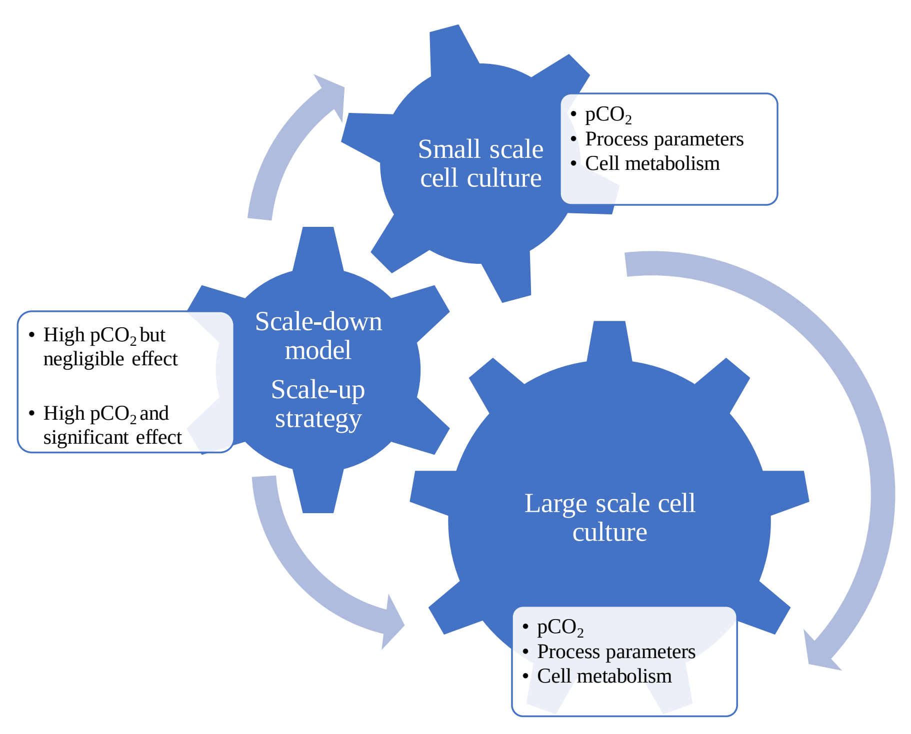


Figure 4. pCO2 control in mammalian cell culture process scale up and down

图 4. 细胞培养工艺放大和缩小过程中 pCO_2 的控制

参考文献

[1] Ahn WS, Antoniewicz MR. Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry[J]. *Metab Eng*, 2011,**13**(5):598-609.
[2] Wahrheit J, Niklas J, Heinzle E. Metabolic control at the cytosol-mitochondria interface in different growth phases of CHO cells[J]. *Metab Eng*, 2014,**23**:9-21.
[3] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009,**324**(5930):1029-1033.
[4] Blombach B, Takors R. CO2 - Intrinsic Product, Essential Substrate, and Regulatory Trigger of Microbial and Mammalian Production Processes[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015,**3**:108.
[5] Hartley F , Walker T , Chung V , et al. Mechanisms Driving the Lactate Switch in Chinese Hamster Ovary cells: Mechanisms Driving the Lactate Switch[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2018, 115(12).
[6] Ahn WS, Antoniewicz MR. Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures[J]. *Biotechnol J*, 2012,**7**(1):61-74.
[7] Spérandio M, Paul E. Determination of carbon dioxide evolution rate using on - line gas analysis during dynamic biodegradation experiments[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2015, 53(3):243-252.
[8] Mostafa S S , Gu X . Strategies for Improved dCO_2 Removal in Large-Scale Fed-Batch Cultures[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(1):45-51.
[9] Xu S, Hoshan L, Jiang R, et al. A practical approach in bioreactor scale-up and process transfer using a combination of constant P/V and vvm as the criterion[J]. *Biotechnology Progress*, 2017,**33**(4):1146-1159.
[10] Brunner M, Braun P, Doppler P, et al. The impact of pH inhomogeneities on CHO cell physiology and fed-batch process performance - two-compartment scale-down modelling and intracellular pH excursion[J]. *Biotechnol J*, 2017,**12**(7).
[11] Erecińska M, Deas J, Silver I A. The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes.[J]. Journal of Neurochemistry, 2010, 65(6):2765-2772.
[12] Bothun GD, Knutson BL, Berberich JA, et al. Metabolic selectivity and growth of Clostridium thermocellum in continuous culture under elevated hydrostatic pressure[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004,**65**(2):149-157.
[13] Richardson D E, Yao H, And K M F ‡, et al. Equilibria, Kinetics, and Mechanism in the Bicarbonate Activation of Hydrogen Peroxide: Oxidation of Sulfides by Peroxymonocarbonate[J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(8):1729-1739.
[14] Richardson D E, Regino C A S, Yao H, et al. Methionine oxidation by peroxymonocarbonate, a reactive oxygen species formed from CO/bicarbonate and hydrogen peroxide[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2003, 35(12):1538-1550.
[15] Gray D R, Chen S, Howarth W, et al. CO2 in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture[J]. Cytotechnology, 1996, 22(1-3):65-78.

[16] Templeton N, Dean J, Reddy P, et al. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013,**110**(7):2013-2024.
[17] Xu S, Jiang R, Mueller R, et al. Probing lactate metabolism variations in large-scale bioreactors[J]. *Biotechnol Prog*, 2018,**34**(3):756-766.
[18] Dezengotita V M , Kimura R , Miller W M . Effects of CO2 and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production[J]. Cytotechnology, 1998, 28(1-3):213-227.
[19] Takuma S, Hirashima C, Piret JM. Dependence on glucose limitation of the pCO2 influences on CHO cell growth, metabolism and IgG production[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007,**97**(6):1479-1488.
[20] Nienow AW. Reactor engineering in large scale animal cell culture[J]. *Cytotechnology*, 2006,**50**(1-3):9-33.
[21] Ray N G, Rivera R, Gupta R, et al. Large-Scale Production of Humanized Monoclonal Antibody Expressed in a GS-NSO Cell Line[M]// Animal Cell Technology. 1997.
[22] Goudar CT, Matanguihan R, Long E, et al. Decreased pCO(2) accumulation by eliminating bicarbonate addition to high cell-density cultures[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007,**96**(6):1107-1117.
[23] deZengotita VM, Schmelzer AE, Miller WM. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO(2) and osmolality: intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002,**77**(4):369-380.
[24] Yoon S K , Ahn Y H , Han K . Enhancement of recombinant erythropoietin production in CHO cells in an incubator without CO2 addition.[J]. Cytotechnology, 2001, 37(2):119-132.
[25] Darja O, Stanislav M, Sasa S, et al. Responses of CHO cell lines to increased pCO2 at normal (37 degrees C) and reduced (33 degrees C) culture temperatures[J]. *J Biotechnol*, 2016,**219**:98-109.
[26] Brunner M, Doppler P, Klein T, et al. Elevated pCO2 affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018,**18**(3):204-214.
[27] Mostafa S S , Gu X . Strategies for Improved dCO2 Removal in Large-Scale Fed-Batch Cultures[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(1):45-51.
[28] Zhu M M , Goyal A , Rank D L , et al. Effects of Elevated pCO_2 and Osmolality on Growth of CHO Cells and Production of Antibody-Fusion Protein B1: A Case Study[J]. Biotechnology progress, 2005, 21(1):70-77.
[29] Osman JJ, Birch J, Varley J. The response of GS-NS0 myeloma cells to single and multiple pH perturbations[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002,**79**(4):398-407.
[30] Ozturk S S . Engineering challenges in high density cell culture systems. Cytotechnol[J]. Cytotechnology, 1996, 22(1-3):3-16.
[31] Li J, Wong CL, Vijayasankaran N, et al. Feeding lactate for CHO cell culture processes: impact on culture metabolism and performance[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012,**109**(5):1173-1186.

[32] Zanghi J A , Schmelzer A E , Mendoza T P , et al. Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO_2 or pH[J]. Biotechnology and bioengineering, 1999, 65(2):182-191.
[33] Buchholz J, Graf M, Freund A, et al. CO_2 /HCO_3^- perturbations of simulated large scale gradients in a scale-down device cause fast transcriptional responses in Corynebacterium glutamicum.[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(20):8775-8775.
[34] Abu-Absi S, Xu S, Graham H, et al. Cell culture process operations for recombinant protein production[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2014,**139**:35-68.
[35] Dreher T, Husemann U, Ruhl S, et al. Design space definition for a stirred single-use bioreactor family from 50 to 2000 L scale[J]. *BMC Proceedings*, 2013,**7**(Suppl 6):P55.
[36] Sieblist C, Hageholz O, Aehle M, et al. Insights into large-scale cell-culture reactors: II. Gas-phase mixing and CO(2) stripping[J]. *Biotechnol J*, 2011,**6**(12):1547-1556.
[37] Matsunaga N, Kano K, Maki Y, et al. Culture scale-up studies as seen from the viewpoint of oxygen supply and dissolved carbon dioxide stripping[J]. *J Biosci Bioeng*, 2009,**107**(4):412-418.
[38] Xing Z, Kenty BM, Li ZJ, et al. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009,**103**(4):733-746.
[39] Xing Z, Lewis AM, Borys MC, et al. A carbon dioxide stripping model for mammalian cell culture in manufacturing scale bioreactors[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017,**114**(6):1184-1194.
[40] Matsunaga N, Kano K, Maki Y, et al. Estimation of dissolved carbon dioxide stripping in a large bioreactor using model medium[J]. *J Biosci Bioeng*, 2009,**107**(4):419-424.